

Análise da dispersão de alguns gêneros roedores akodontinos nas terras baixas da América do Sul através do seqüenciamento do gene mitocondrial Citocromo B

ALINE MORAIS DA ROSA¹
MARTIN ALEJANDRO MONTES²
MARGARETE SUÑÉ MATTEVI³

RESUMO

A subfamília Sigmodontinae, restrita a América do Sul, representa cerca de 55% das espécies de roedores deste subcontinente. Suas espécies agrupam-se em sete tribos, sendo que cerca de 87,% das mesmas pertence a três delas. Akodontini é a segunda mais expressiva delas. Para explicar a presente distribuição de todos os Akodontini é necessário assumir que a maior parte dos taxa se originou no que atualmente é o sul da região da Puna e que migraram em várias direções e experimentaram novas diferenciações em outras áreas. Neste artigo dentro do clado akodontino que ocupou as terras baixas da América do Sul, analisou-se o padrão de dispersão de alguns gêneros através de suas seqüências do gene mitocondrial citocromo b.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, citocromo b, roedores sul-americanos, akodontinos, filogeografia.

¹ Acadêmica do Curso de Biologia/ ULBRA – Bolsista PROICT/ULBRA

² Doutorando do Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – UFRGS

³ Professora – Orientadora do Curso de Biologia/ULBRA e do Pós -Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ ULBRA (mattevi@ulbra.br)

ABSTRACT

The Sigmodontinae subfamily, restricted to the South America, represents about of 55% the species of this subcontinent. Its species is grouped in seven tribes, 87% of them belonging only to three of this tribes. Akodontini is the most representative of them. To explain its nowadays distribution in necessary to assume that the majority of its taxa had originated at the south of Puna region. From this origin, they migrate to different locals thought diverse routes while suffering several changes during this process. In this paper we analyzed, by means the cytochrome b sequences, the dispersion pattern of the some genera of the akodontini clade from the lowland South America.

Key words: mitochondrial DNA, cytochrome b, South America rodents, akodontini, phylogeographic.

REVISÃO DA DISPERSÃO DA TRIBO AKODONTINI

A ordem Rodentia possui aproximadamente 468 gêneros e 2.052 espécies, representando, assim, cerca de 37,5% dos gêneros e 43,5% das espécies de mamíferos atuais (ROSE & ARCHIBALD, 2005). Estas cifras demonstram a importância desta ordem dentro da classe Mammalia a qual tem uma grande importância na América do Sul, pois representa aproximadamente 42% das espécies de mamíferos que habitam esse subcontinente (REIG, 1981).

Os roedores atualmente habitam todas as regiões do mundo, exceto a Antártida. Na Nova Zelândia e algumas ilhas oceânicas eles eram originalmente ausentes, mas foram introduzidos pelo homem (WILSON & REEDER, 2005). Outra característica dessa ordem é a sua adaptação aos mais variados tipos de clima, sendo encontrados desde o nível do mar e até mesmo em altitudes elevadas em quase todos os biomas.

O registro fóssil dos roedores é incompleto e com muitas interrogações, devido à carência de achados científicos que permitam identificar as formas intermediárias para estabelecer a sua origem, bem

como elucidar as relações filogenéticas entre os roedores e outros mamíferos. Recentes trabalhos moleculares, de FRYE & HEDGES (1995), empregando os genes mitocondriais (RNA12S, 16S e tRNA-valina) e de HUCHON et al. (2002), utilizando três genes nucleares (Fator von Willebrand, proteína ligante do interfotoreceptor retinóide e receptor adrenérgico alfa 2B) suportam a monofilia da ordem Rodentia e a associação desta ordem com a ordem Lagomorpha, formando o clado Glires.

A ordem Rodentia foi classificada em duas subordens: Sciuromorpha e Hysticomorpha (WILSON & REEDER, 2005). A sub-ordem Sciuromorpha está dividida em 11 famílias, sendo a família Muridae a mais representativa em número de espécies (WILSON & REEDER, 2005).

Várias espécies da família Muridae causam grandes danos para as populações humanas, uma vez que são vetores e reservatórios de um grande número de doenças. Algumas das espécies desta família também são responsáveis por enormes prejuízos para a agricultura, danificando culturas e sementes estocadas. Contudo, muitas espécies são benéficas, atuando como controles biológicos de insetos prejudiciais, como dispersores de sementes e

apresentando uma imensa utilidade para investigações médicas.

A subfamília Sigmodontinae dos roedores murídeos representa um dos mais diversos e complexos grupos de mamíferos do novo mundo.

Os gêneros dos Sigmodontinae são intimamente ligados uns com outros na morfologia de muitos sistemas de órgãos (REIG, 1980, 1981; CARLETON, 1980; VOSS & LINZEY, 1981). Estas relações próximas são também corroboradas pelos dados cromossômicos (GARDNER & PATTON, 1976; PEARSON & PATTON, 1976) e de ectoparasitos (WENZEL & TIPTON, 1966). Sua distribuição geográfica é muito ampla, indo desde o Canadá na América do Norte até a Patagônia na América do Sul. No entanto, os sigmodontinos se distribuem principalmente na América do Sul e representam 21,9% dos mamíferos da América do Sul vivos, sendo por isto, a maior subfamília de mamíferos deste subcontinente.

As espécies de Sigmodontinae agrupam-se em sete tribos, sendo que cerca de 87,% das mesmas pertence a três delas: Oryzomyini, Phyllotini e Akodontini (VORONTZOV, 1959). Akodontini, é a segunda mais expressiva, apresentando 24,9% das espécies vivas descritas. Por serem principalmente andinos, com a maioria das espécies distribuídas nesta região, REIG (1984) propôs que os Akodontini devam ter se diferenciado nesta cordilheira, sugerindo que a área de diferenciação dos Akodontini se encontra na zona entre o sul dos Andes centrais e o norte dos Andes do sul, já que este é o local com mais abundância de espécies, gêneros e subgêneros da tribo (BIANCHI *et al.*, 1971; REIG, 1986).

Para explicar a presente distribuição de todos os Akodontini é necessário assumir que a maior parte dos taxa se originou no que atualmente é o

sul da região da Puna e que migraram em várias direções e experimentaram novas diferenciações em outras áreas (REIG, 1986). Este autor, então, propõe três direções principais de dispersão da tribo: a dispersão para o sul de um *Akodon* generalista que ocupou as terras altas dos Andes, uma dispersão para o norte seguindo a margem oriental dos Andes, e a terceira dispersão foi para as terras baixas do oriente (Figura 1).



Figura 1 - Área de diferenciação original (ADO) da tribo Akodontini. As setas representam as possíveis formas de dispersão desta tribo que foram propostas por REIG (1986).

Na última década, estudos moleculares têm tentado contribuir ao esclarecimento de questões de filogenia e de tempo de divergência de mamíferos de vários grupos. Neste sentido, o desenvolvimento de novas tecnologias no campo da biologia molecular,

especialmente o da PCR (reação em cadeia da polimerase), permitiu a popularização de métodos moleculares em diversas áreas do conhecimento. A filogenética/biologia molecular tem sido uma das principais ferramentas para o estudo da biodiversidade, permitindo desde identificar táxons e inferir padrões de distribuição espacial da diversidade genética, até testar hipóteses explícitas de biogeografia histórica e definir áreas prioritárias de conservação. É um campo novo de estudo cuja maior parte das análises utiliza o mtDNA (DNA mitocondrial). O emprego preferencial desta molécula como ferramenta advém de algumas propriedades altamente favoráveis aos estudos filogenéticos que apresenta, principalmente por ser haplóide e herdada sem recombinação através das fêmeas, além de possuir muitas cópias, rápida taxa evolutiva e extensivo polimorfismo intra-específico. Frequentemente os múltiplos alelos (haplótipos) do mtDNA podem ser ordenados filogeneticamente, fornecendo genealogias de genes que correspondem à genealogia matriarcal dos organismos. O esperado básico é que grupos monofiléticos identificados pelas reconstruções filogenéticas irão surgir a partir de barreiras ao fluxo gênico. Na maior parte das vezes estas barreiras estão associadas a eventos de vicariância os quais provocaram a separação espacial das populações e, por decorrência, os clados de mtDNA tendem, também, a se agrupar geograficamente. A superposição das árvores filogenéticas nos mapas de distribuição constitui o elemento fundamental da análise filogeográfica. Dentre os genes mitocondriais o citocromo *b* é o que mais tem sido utilizado para o estabelecimento de relações filogenéticas e filogeográficas de mamíferos. Para certos casos se utilizam, também, outros genes mitocondriais como o 12sRNA e NADH.

Dentro do clado akodontino, que ocupou as terras baixas da América do Sul, analisou-se o padrão

de dispersão de alguns gêneros, entre eles Necromys, Deltamys e Thaptomys através do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b.

Necromys, onívoro e um dos mais especiosos dentro da tribo Akodontini, é composto por oito espécies: *N. amoenus*, *N. lactens*, *N. temchuki*, *N. puntulactus*, *N. linguarum*, *N. urichi*, *N. obscurus* e *N. lasiurus*. Estas espécies encontram-se distribuídas no Peru, Brasil, Paraguai, Bolívia, Uruguai e Argentina. Este gênero tem sido denominado de *Bolomys* e também *Cabreramys* (EISENBERG & REDFORD, 1999). REIG (1987) relacionou os caracteres diagnósticos deste gênero, o qual apresenta um crânio amplo e profundo, uma curta região occipital, um rostrum marcadamente cônico e curto, os frontais sempre maiores que os nasais, os parietais menores que os frontais.

Deltamys originalmente proposto como um gênero monotípico, *D. kempi*, em base a dados morfológicos tem sido considerado ou como um gênero pleno ou como um subgênero do gênero *Akodon* da tribo Akodontini dos Sigmondontinae neotropicais. Estudos citogenéticos diversos evidenciaram que *Deltamys* apresenta características muito especiais do cariótipo: não mostra o pequeno par metacêntrico considerado marcador do gênero *Akodon*; apresenta fusões cênicas específicas em diferentes locais de Planície Costeira do Rio Grande do Sul (Taim com cromossomo 1 fusionado ao 13; Tapes com o cromossomo 2 fusionado ao 3 e Tramandaí com cromossomo 9 fusionado ao 15); e, além disto, possui um sistema único de determinação do sexo ($X_1 X_1 X_2 X_2 / X_1 X_2 Y$).

Já o gênero *Thaptomys* pertence à tribo Akodontini de roedores sigmodontíneos sul-americanos. É monotípico e sua única espécie, *T. nigrita*, apresenta uma distribuição geográfica

que se estende do este do Paraguai, sudeste do Brasil e nordeste da Argentina. Essa espécie é característica de ambientes úmidos e dificilmente é capturada.

O DNA é extraído a partir de tecidos (coração, rim, fígado e músculo) através do procedimento de precipitação com sal descrito por MEDRANO et al. (1990) com algumas modificações. A amplificação do gene mitocondrial citocromo *b* é feita utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) descri-

tos na literatura (BIBB et al., 1981) para *Mus musculus*. Optou-se por amplificar o gene alvo mediante a utilização de dois conjuntos de “primers”: o primeiro conjunto inclui os primers MVZ 5 (tRNA-Glu) e o MVZ 16 (um “primer” interno, descrito em SMITH & PATTON, 1999) que produz um fragmento de 878 pb correspondente à primeira parte do citocromo *b*; o segundo conjunto inclui os “primers” MVZ 14 (tRNA-Thr) e MVZ 23 (“primer” interno, DA SILVA & PATTON, 1993) que produz um fragmento de 605 pb (Figura 2).

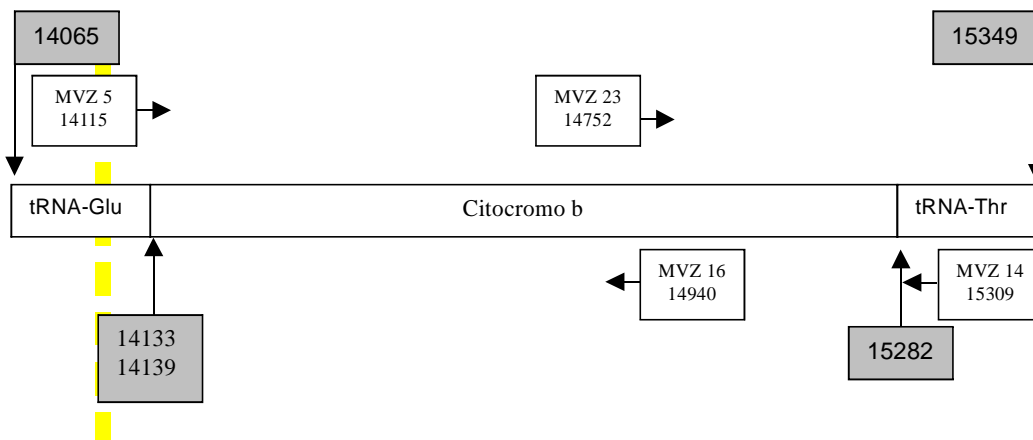


Figura 2. Representação parcial do genoma da mitocôndria, mostrando os genes tRNA-Glu, citocromo *b* e tRNA-Thr. As caixas cinzas indicam a posição de início e fim dos genes e as caixas brancas os “primers” e suas posições segundo a sequência da mitocôndria de *Mus musculus*.

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) são feitas utilizando-se programas específicos para cada par de “primers”. Os produtos das PCR são quantificados, por comparação visual, com um marcador de baixo peso molecular (“Low DNA Mass Ladder”). O sequenciamento está sendo feito com os mesmos “primers” da amplificação, de forma automática, utilizando um sequenciador ABI-PRISM 3100.

As sequências obtidas foram lidas utilizando-se o programa Chromas 1.45, os cromatogramas resultantes foram analisados no programa CONSED, alinhados com o Clustal X (THOMPSON et al., 1997) e revisados manualmente com o auxílio do programa Bioedit (HALL et al., 1999). A composição das bases é obtida pelo programa MEGA 2.0 (KUMAR et al., 2001).

O marcador mitocondrial citocromo b evidenciou os padrões pelos quais os roedores akodontinos, *Deltamys kempi*, *Necromys lasiurus* e *Thaptomys nigrita*, dispersaram-se pelos distintos biomas que ocupam e indicaram quais as possíveis rotas utilizadas por estes gêneros para ocupar a costa leste do continente sul-americano, desta forma corroborando ou não, a hipótese de sua possível origem andina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIANCHI, N. O. et al. Cytogenetic of the South American akodont rodents (Cricetidae). I A progress-report of Argentinian and Venezuelan forms. **Evolution**, v.21, p.724-736, 1971.

BIBB, M. et al. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. **Cell**, v.26, p.167-180, 1981.

CARLETON, M. D. Phylogenetic relationships on neotomine-peromyscine rodents (Muroidea) and reappraisal of the dichotomy within New World Cricetinae. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan**, v.157, p.1-146, 1980.

D'ELÍÁ, G. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. **Cladistics**, v.19, p.307-323, 2003.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics, the central neotropics**. Chicago: University of Chicago, v.3. p.609, 1999.

FRYE, M.; HEDGES, S. Monophyly of the order Rodentia inferred from mitochondrial DNA sequences of the genes for 12S rRNA, 16S rRNA, and tRNA-Valine. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.168-176, 1995.

GARDNER, A. L.; PATTON, J. L. Karyotypic variation in oryzomyine rodents (Cricetinae) with comments on chromosomal evolution in the Neotropical cricetine complex. **Museum of Zoology Louisiana State University**, v.49, p.1-48, 1976.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

HUCHON, D. et al. Rodent phylogeny and a timescale for the evolution of glires: evidence from an extensive taxon sampling using three nuclear genes. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p.1053-1065, 2002.

JANSA, S. A.; WEKSLER, M. Phylogeny of muroid rodents: relationships within and among major lineages as determined by IRBP gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.31, p.256-276, 2004.

KUMAR, S. et al. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. **Bioinformatics**, v.17, p.1244-1245, 2001.

MEDRANO, J. F.; AASEN, E.; SHARROW, L. DNA extraction nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v.8, p.43, 1990.

PEARSON, O.; PATTON J. Relationships among South American phyllotine rodents based on chromosome analysis. **Journal of**

Mammalogy, v.57, p.339-350, 1976.

REIG, O. A. A proposed unified nomenclature for the enamelled components of the molar teeth of the Cricetidae (Rodentia). **Journal of Zoology London**, v.181, p.227-241, 1977.

REIG, O. A. A new fossil genus of South American cricetid rodents allied to *Wiedomys*, with an assessment of the Sigmodontinae. **Journal of Zoology**, London, v.192, p.257-281, 1980.

REIG, O. A. An assessment of the systematics and evolution of Akodontini, with the description of new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). **Fieldiana Zoology New Series**, v.39, p.347-399, 1987.

REIG, O. A. Distribuição geográfica e história evolutiva dos roedores muroideos sulamericanos (Cricetidae: Sigmodontinae). **Revista Brasileira de Genética**, v.7, p.333-365, 1984.

REIG, O. A. Diversity patterns and differentiation of high Andean rodents. in High altitude tropical biogeography. In: VUILLEUMIER, F.; MONASTERIO, M. (Eds). **Oxford University Press**. 1986. p. 404-439.

REIG, O. A. Teoría del origen y desarrollo de la fauna de mamíferos de America del Sur. **Museo Municipal de Ciencias Naturales Lorenzo Scaglia**, v.1, p.41, 1981.

ROSE, K. D.; ARCHIBALD, J. D. The rise of placental mammals: origins and relationships of the major extant clades. **Johns Hopkins University Press**: Baltimore, p. 259, 2005.

SILVA, M. N. F. da; PATTON J. L. Amazonian phylogeography: mtDNA sequence variation in

arboreal echimyid rodents (Caviomorpha). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.2, p.243-255, 1993.

SMITH, M.; PATTON, J. Phylogenetic relationships and the radiation of sigmodontine rodents in South America: evidence from cytochrome *b*. **Journal of Mammalian Evolution**, v.6, p.89-128, 1999.

THOMPSON, J. D. et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876-4882, 1997.

VORONTZOV, N. N. Sistema Khomiakov (Cricetidae) mirovoi fauny i ikh filogeneticheskie svyazi. **Biull Mosk Obsh Isp Priir**, v. 44, p.134-137, 1959.

VOSS, R. S.; LINZEY, A. V. Comparative gross morphology of male accessory glands among Neotropical Muridae (Mammalia: Rodentia) with comments on systematic implications. **Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan**, p.1-41, 1981.

WEKSLER, M. Phylogeny of neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, p.331-349, 2003.

WENZEL, R. L.; TIPTON, V. J.; KIEWLICZ, A. The streblid batflies of Panama (Diptera: Calyptridae: Streblidae), p. 405-675. In: WENZEL, R. L.; V.J. TIPTON, V. J. (Eds.). *Ectoparasites of Panama*. Chicago, **Field Museum of Natural History**, p. 861, 1966.

WILSON, D. E.; REEDER, D. A. Mammal Species of the World - A Taxonomic and Geographic Reference. **Smithsonian Institution Press**, v.1 p.1206, 1993.

WILSON, D. E.; REEDER, D. A. Mammal Species of the World - A Taxonomic and geographic reference. **Smithsonian Institution Press**, v.2 p.745-1599, 2005.